

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 49/00, 41/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/57668 (43) 国際公開日 1998年12月23日(23.12.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02648 (22) 国際出願日 1998年6月16日(16.06.98) (30) 優先権データ 特願平9/160945 1997年6月18日(18.06.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 コスモ総合研究所 (COSMO RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] コスモ石油株式会社(COSMO OIL CO., LTD.)(JP/JP) 〒105-0023 東京都港区芝浦一丁目1番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田中 徹(TANAKA, Tohru)[JP/JP] 〒340-0112 埼玉県幸手市権現堂1134-2 株式会社 コスモ総合研究所 研究開発センター内 Saitama, (JP) 佐々木寛(SASAKI, Hiroshi)[JP/JP] 〒105-0003 東京都港区西新橋三丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: DIAGNOSTIC AGENTS AND REMEDIES FOR MALIGNANT TUMORS (54) 発明の名称 悪性腫瘍診断剤及び治療剤 (57) Abstract Diagnostic agents or photodynamic remedies for malignant tumors containing as the active ingredient compounds wherein at least one carbon atom of 5-aminolevulinic acid is a carbon isotope or the nitrogen atom in the amino group thereof is a nitrogen isotope, esters, amides or salts of these compounds or hydrates or solvates thereof.		

(57)要約

5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるか若しくはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物を有効成分とする悪性腫瘍診断剤、または光動力学的悪性腫瘍治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ウイエトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明 細 書

悪性腫瘍診断剤及び治療剤

技術分野

本発明は、同位体置換された化合物を用いる悪性腫瘍診断用薬剤及び光動力学的悪性腫瘍治療剤に関する。

背景技術

多くの感染症が克服された現代において悪性腫瘍は人類が直面している最大の疾病の一つである。悪性腫瘍の治療方法が次々に提案されており、治癒率も向上してきたが、悪性腫瘍を治療する上で最も大切なのは悪性腫瘍を早期に発見することであるといわれている。このため悪性腫瘍の早期発見のために各種のガンマーカーが提案されており、すでに様々な診断薬が発売されているが、その有効性には問題が残されており、また、ガンマーカーの値が高ければ悪性腫瘍の疑いが高いと言うものの悪性腫瘍が存在する位置については何の情報も得られない。

最近、ヘマトポルフィリンやその誘導体（いわゆるポルフィリン類）が悪性腫瘍に特異的に集積することが知られ、更に、これらの化合物が光照射により蛍光を発する事からこの性質を利用した悪性腫瘍の診断方法も開発された。これらポルフィリン類のうち代表的な化合物であるフォトフリンは光照射により活性酸素を発生し悪性腫瘍を破壊することが知られており、悪性腫瘍の治療薬として認可され、これを用いた治療は光動力学的治療として注目されている（ポルフィリン・ヘムの生命科学、ポルフィリン研究会編、東京化学同人（1995））。

1994年に入って、5-アミノレブリン酸を投与すると誘導されるプロトポルフィリン IX が腫瘍に集積してポルフィリン類と同様な効果をもつことが見出され、上記ポルフィリン類に比べて毒性や光毒性が低く体内での代謝も早いことから注目されている。

そして、このことを応用し、5-アミノレブリン酸の一部の水素を重水素（D）で置換し、MRI（磁気共鳴画像）用造影剤として用いるという報告がある（WO 97/03042）。

しかしながら、この造影剤を用いたMRIは、感度が必ずしも十分ではなかった。

従って、本発明の目的は、悪性腫瘍に良好に集積し、核磁気共鳴法を用いて感度よく、腫瘍の位置を特定し得る診断剤及び光動学的悪性腫瘍治療剤を提供することにある。

発明の開示

斯かる実情に鑑み本発明者は5-アミノレブリン酸の代謝やポルフィリン類の性質等について鋭意研究を行った結果、5-アミノレブリン酸の炭素原子又は窒素原子をそれらの同位体で置換した化合物を用いれば、前記重水素置換化合物に比べて感度よく悪性腫瘍を検出できること、更にこの同位体置換化合物は非置換体と同等の光動学的な悪性腫瘍の治療効果を有することを見出し本発明を完成した。

すなわち本発明は、5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド若しくは塩、水和物、または溶媒和物を有効成分とする悪性腫瘍診断剤、並びに光動学的悪性腫瘍治療剤を提供するものである。

さらに、本発明は、5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物、および診断剤上許容される担体または製薬上許容される担体からなる組成物を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は製造例4で得た ^{13}C 置換5-アミノレブリン酸のNMRスペクトルを示す図である。

発明を実施するための最良の様態

5-アミノレブリン酸を用いれば、そのままで、核磁気共鳴法を利用して、これが全く投与されない場合に比べれば感度よく悪性腫瘍が検出できる。しかし、5-アミノレブリン酸の炭素原子や窒素原子をその同位体に置換した化合物を用いれば、更に感度よく悪性腫瘍が検出される。

本発明において、炭素同位体としては ^{13}C 、 ^{14}C が挙げられるが、 ^{13}C が被爆のおそれがなく、安定性に優れるためより好ましい。また窒素同位体としては、 ^{13}N 、 ^{15}N が挙げられるが、同様の理由で ^{15}N が好ましい。

炭素同位体として ^{13}C を用いた化合物としては、5-アミノレブリン酸の炭素のうち、2、3、4、5位のうちのいずれか一つ若しくは二つ以上の炭素が ^{13}C に置換された5-アミノレブリン酸が挙げられる。

この化合物を用いた場合には ^{13}C -NMRを測定することにより高感度での悪性腫瘍の診断が可能である。天然界における ^{13}C の存在比は小さいため悪性腫瘍は正のシグナルとして検出される。 ^{13}C -NMRの原理を用いた画像診断装置を用いれば画像診断が容易なことは言うまでもない。

また、窒素同位体で置換された5-アミノレブリン酸としては、5-アミノレブリン酸のアミノ基の窒素が ^{15}N である5-アミノレブリン酸が挙げられる。

この化合物を用いた場合には ^{15}N -NMRを測定することにより高感度での悪性腫瘍の診断が可能である。天然界における ^{15}N の存在比は小さいため悪性腫瘍は正のシグナルとして検出される。 ^{15}N -NMRの原理を用いた画像診断装置を用いれば画像診断が容易なことは言うまでもない。

また、上記 ^{13}C 置換体と ^{15}N 置換体とを組み合わせ、炭素同位体と窒素同位体の両方を含む5-アミノレブリン酸を用い、複数のNMRを測定することにより、更に正確な診断を行うこともできる。

なお、5-アミノレブリン酸の水素のうち、2、3、5位の水素、アミノ基の水素のうちの1つもしくは2つ以上の水素が重水素(^2H 又はD)である5-アミノレブリン酸

を用いた場合でもH-NMRを測定することにより悪性腫瘍の診断が可能である。しかしながら重水素がプロトポルフィリンに取り込まれる率は、炭素原子や窒素原子よりも少ない。

また、 ^3H (T) や ^{14}C 等の放射性の同位体を含む場合はオートラジオグラフィーとの組み合わせも可能であり、研究目的には極めて有効であるが人体に使用する場合は内部被爆の影響を考慮する必要がある。更に、5-アミノレブリン酸が含有するカルボン酸上の酸素の同位体についても同様の応用が可能であるが5-アミノレブリン酸のカルボン酸の酸素原子がプロトポルフィリン IX に残存する確率は25%と他の原子の場合より小さい。

参考のため、5-アミノレブリン酸のそれぞれの原子がプロトポルフィリン IX に残存する確率と5-アミノレブリン酸から誘導されたプロトポルフィリンの原子比を表1に示す。

表 1

構造	残存確率			原子比		
	炭素	窒素	水素	炭素	窒素	水素
$^1\text{COOH}$	1 / 4	—	0 *	2 / 3 4	—	0 *
$^2\text{CH}_2$	1	—	1	8 / 3 4	—	4 / 3 2
$^3\text{CH}_2$	1	—	3 / 8	8 / 3 4	—	3 / 6 4
$^4\text{C=O}$	1	—	—	8 / 3 4	—	—
$^5\text{CH}_2$	1	—	1 / 2	8 / 3 4	—	2 / 3 2
NH_2	—	1 / 2	1 / 4	—	1	1 / 3 2

* : 交換反応のため実質上は0となる。

表 1 の残存確率が高い方が利用効率が高く、原子比が高い方が測定時の感度が高い。複数の同位体が置換している化合物の原子比は加算によって求められる。表中の値はそれぞれ原子 1 個当たりの値である。

表 1 から明らかなように、本発明に用いる炭素同位体又は窒素同位体置換 5-アミノレブリン酸は、重水素置換体に比べて測定感度が高い。

本発明に用いる同位体置換された 5-アミノレブリン酸は、自体公知の方法で製造することができるが、同位体置換されたグリシンを 5-アミノレブリン酸産生微生物又はこの微生物由来の酵素に作用させて製造するのが好ましい。

原料同位体置換グリシンとしては、メチレン基の炭素原子が ^{13}C であるもの、窒素原子が ^{15}N であるものが好ましい。これら原料同位体置換グリシンは、1カ所が同位体で置換されていても良いし、複数の箇所が同位体で置換されていても良い。このような同位体置換グリシンは公知の方法で製造することができ、また市販品（昭光通商（株）製、Glycine- ^{15}N N15-0119、Glycine-2- ^{13}C C13-0119、Glycine-2- ^{13}C , ^{15}N M-0019；アルドリッチ社製、Glycine- ^{15}N 29, 929-4、Glycine-2- ^{13}C 27, 943-9、Glycine-2- ^{13}C , ^{15}N 29, 932-4を用いてもよい。

ここで用いる 5-アミノレブリン酸産生微生物としては、5-アミノレブリン酸の合成に C4 経路を使うものが好ましい。

このような微生物は酵母、カビ、光合成細菌、リゾビウム等多岐にわたるがこれらの微生物の中でとりわけ光合成細菌は高い 5-アミノレブリン酸生産能力を有しており、特にロドスピリウム属 (*Rhodospirillum* 属)、ロドシュウドモナス属 (*Rhodopseudomonas* 属)、クロマチウム属 (*Chromatium* 属)、ロドバクター属 (*Rhodobacter* 属)、更にロドバクターセファロイデス (*Rhodobacter sphaeroides*) が高い能力を有している。

また、5-アミノレブリン酸の生産性を向上させた変異株を用いることもできる。このような変異株としては、例えば通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に寄託された *Rhodobacter sphaeroides* CR-5

20 (FERM BP-5255; 国際寄託日: 1995年10月2日)、CR-450 (FERM P-14085)、CR-386 (FERM P-13159)、CR-286 (FERM P-12542) 等を挙げることが出来る。

5-アミノレブリン酸を産生する微生物を用いて目的物である同位体置換5-アミノレブリン酸を製造するには、上記微生物を前記同位体置換グリシン及びレブリン酸等の存在下培養し、その培養物から目的とする同位体置換5-アミノレブリン酸を採取すればよい。同位体置換グリシンの培地への添加量は1mM~500mM、特に5mM~240mMとすることが望ましく、レブリン酸の添加量は親株を用いる場合は10mM~300mM、特に20mM~180mMとすることが望ましく、上述の変異株を用いる場合は0.1mM~100mM、特に1mM~30mMとすることが望ましい。

上記微生物の培養条件は、特に制限されるものではなく、例えば、上記CR-450の場合は、通常のロドバクター属の微生物と同様な条件で培養できる (特開平7-246088号公報)。すなわち、CR-450の培養条件は、特に限定されるものではなく、一般には10~40℃、好ましくは20~35℃の好気条件において培養すればよく、また、上記培地のpHは5~8、特に5.5~7.5とすることが好ましい。なお、5-アミノレブリン酸の生産時にpHが変化する場合には、水酸化ナトリウム、アンモニア、水酸化カリウム等のアルカリ溶液や塩酸、硫酸、リン酸等の酸を用いてpHを調整することが好ましい。

また、同位体置換5-アミノレブリン酸の生産はこれらの微生物の増殖と同時に行うこともでき、菌体の増殖と独立して行うこともできる。この場合、使用する微生物は、増殖基菌体、休止菌体のいずれでもよく、そのまま同位体置換5-アミノレブリン酸の生産に使用することができるが、遠心分離等の方法により集菌し、培地やリン酸緩衝液等の適当な溶媒に再懸濁させるなどの方法を採用することにより、菌濃度を高くして用いることもできる。

培養物から同位体置換 5-アミノレブリン酸を採取するには、培養により同位体置換 5-アミノレブリン酸は菌体外に分泌されるので通常、培養液から、イオン交換樹脂を用いる等の手段により分離すればよい。

上記以外に本発明に適用できる同位体置換 5-アミノレブリン酸の生産方法としては、例えば特開平 3-172191 号公報、特開平 6-169758 号公報、特開平 5-95782 号公報、特開平 6-141875 号公報、特開平 6-153915 号公報、特開平 8-168391 号公報等に記載の方法が挙げられる。

一方、5-アミノレブリン酸産生微生物由来の酵素を用いて同位体置換 5-アミノレブリン酸を製造するには、原料として同位体置換グリシンを用いる以外は公知の方法（特開平 6-169758 号公報）により行うことができる。

詳細には、例えば次の様にして同位体置換 5-アミノレブリン酸を製造することができる。

まず、酵素としては、5-アミノレブリン酸産生微生物の培養物をそのまま用いるか、又は遠心分離器等で菌体分離したものをを用いる。なお、分離した菌体は、更に、リン酸緩衝液等の溶液で洗浄し、該溶液に懸濁させて使用することもできる。

また、菌体由来の酵素は、常法により精製したものを使用することが望ましい。

すなわち、例えば、上記した菌体の懸濁液を、超音波、フレンチプレス、高圧ホモジナイザ等により破碎処理して得られた菌体破碎物を、遠心分離等により固液分離した後、カラム精製、電気泳動等の一般的精製手段により精製酵素としたものを使用する。

更に、これらの休止菌体や菌体由来の酵素は、固定化すると単位体積当たりの酵素量が多くなるため、固定化したものを使用すると、効率良く反応を行うことができる。

この固定化は、アルギン酸カルシウム法、ポリアクリルアミドゲル法、ポリウレタン樹脂法、光架橋樹脂法等の常法により行うことができる。

これらの休止菌体や菌体由来の酵素に、同位体置換グリシンとコハク酸等を、リン酸緩衝液中で接触させると、反応が生じて同位体置換 5-アミノレブリン酸が製造される。

このときの反応条件は、CR-17株の変異・分離の場合の条件（特開平6-169758号公報）と同様とするのが好ましい。なお、酵素を使用する場合は、光照射は不要である。

この反応において、エネルギー源として、ATP（アデノシン三リン酸）、ピリドキサルリン酸、CoA（コエンザイムA）、またメタノール、エタノール、水素、ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド（NAD）、ホルムアルデヒド、蟻酸等の電子供与体を適宜添加するのが好ましい。

なお、この反応において、5-アミノレブリン酸デヒドラターゼの活性阻害物質を添加することができる。

以上の如くして得られた同位体置換5-アミノレブリン酸は、粗精製物をそのまま用いてもよいし、目的に応じて常法により精製してもよい。

同位体置換5-アミノレブリン酸は、投与後、体内において、同様な作用を示す誘導体にして用いてもよい。このような化合物としては、5-アミノレブリン酸のエステル、アミド又は塩が挙げられる。このうち、エステル又はアミドとしては具体的には、例えば、5-アミノレブリン酸メチルエステル、5-アミノレブリン酸エチルエステル、5-アミノレブリン酸プロピルエステル、5-アミノレブリン酸ブチルエステル、5-アミノレブリン酸ペンチルエステル、5-アミノレブリン酸ヘキシルエステル、5-アミノレブリン酸ヘプチルエステル、5-アミノレブリン酸オクチルエステル、5-アミノレブリン酸ノニルエステル、5-アミノレブリン酸ドデシルエステル、5-アミノレブリン酸ヘキサデシルエステル、5-アミノレブリン酸イソプロピルエステル、5-アミノレブリン酸シクロヘキシルエステル、5-アミノレブリン酸ベンジルエステル、5-アミノレブリン酸フェネチルエステル、5-アミノレブリン酸-3-フェニルプロピルエステル、5-アミノレブリン酸エトキシエチルエステル、5-アミノレブリン酸-2-（ヒドロキシメチル）テトラフラニルエステル、5-アミノレブリン酸-2-（ヒドロキシメチル）テトラヒドロピラニルエステル、5-アミノレブリン酸アセトアミド、5-アミノレブリン酸-n-ヘキサノイックアミド、5-アミノレブリン酸-n-ノナ

ノイックアミド等が挙げられる。また塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、コハク酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、グリコール酸塩、メタンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等の有機酸塩、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アンモニウムあるいはアルキルアンモニウム塩等が挙げられる。更に、これらの同位体置換 5-アミノレブリン酸、そのエステル、アミド又は塩は、水和物又は溶媒和物を形成していてもよい。これらの化合物及びその合成方法は特開平 4-9360 号公報に記載されている。

本発明の悪性腫瘍診断剤及び治療剤は、上記同位体置換 5-アミノレブリン酸等を有効成分とするものであり、被検体に害を及ぼさないものであれば特に剤型は限定されない。ただし、水溶液とする場合は、投与時の pH に留意することが必要である。すなわち、pH が 8 以上のアルカリ条件下では、有効成分が酸化的に分解するので長時間アルカリ条件下に置くことは好ましくなく、静注用の薬剤の調製等がアルカリ性とする場合は短時間で処理することが好ましい。また、やむを得ず長時間の保存が必要な場合は窒素パージなどの方法で溶液中の溶存酸素を低下させておくことが望ましい。

好ましい pH は 8 以下、特に 7 以下、更に 6.1 以下である。pH の下限については特に制限がないが 2～3 程度が好ましい。

本発明の悪性腫瘍診断剤又は治療剤の投与方法は特に限定されず、例えば経口投与しても静脈注射により投与しても良いし、患部やその周辺に塗布して用いたエアロゾルとして吸入により投与しても良い。更に、坐薬として投与する事も可能である。

投与量は診断に加え治療も目的とする場合は全身への投与の場合、体重 1 kg 当たり 10 mg～10 g、より望ましくは 100 mg～1 g 必要であるが塗布等による局所投与の場合は更に減ずることが可能である。また、診断のみを目的とする場合は投与する物質の同位体純度や測定機の感度により異なるが投与量をかなり減ずることができる。現有の機器を用い、同位体純度が 100% の場合には治療の場合の 1/10 以下の投与量で十分である。診断時の投与量は今後の測定器の感度向上により減少させられることが予想

できるが、投与量が多い場合に問題はない。ただし、治療の場合の薬量以上の投与は経済的に不利である。診断と治療を同時に行う場合は同位体を含まない5-アミノレブリン酸を添加し同位体純度を下げることで経済的な負担を軽減することもできる。

投与後測定、治療までの時間は投与方法や対象とする腫瘍によって若干異なるが投与後1～8時間の間でポルフィリン類の存在比が最大になることが多い。経済的にみればポルフィリン類の蓄積量は腫瘍で早く正常組織で遅い傾向がある。治療を行う場合は被検者の腫瘍の種類毎にポルフィリン類の存在比が最大になる時間を測定し、その後に最大存在比となる時間において光動力学的治療を行うのが最も効果的である。

光動力学的治療に関しては同位体で置換されていない5-アミノレブリン酸を用いた場合と全く同じ手法を用いることができる。(C.S.Loh *et al.*, *Br. J. Cancer*, 68, 41-51 (1993))。すなわち、5-アミノレブリン酸の投与で誘導され、かつ癌細胞に特異的に蓄積したポルフィリン類に光を照射することにより、癌細胞を選択的に死滅させる方法を用いることができる。

ここで、治療に用いる光照射はどのような光であっても有効であるがポルフィリンの吸収波長を含むことが望ましい。このような波長の範囲は400nm～800nmが好ましく、より好ましくは600nm～700nmである。照射する光の照度は強ければ強いほど殺癌力が強いが強すぎた場合、正常細胞にも傷害を与えるので、癌の大きさや深さに応じて照射することが肝心である。肺癌、胃癌、喉頭癌、直腸癌、大腸癌、十二指腸癌、膀胱癌等の場合は内視鏡と組み合わせてレーザー光を照射する事で手術を伴わずにPDT治療を行うことが出来る。レーザー光を用いる場合は照射時間で照射を加減することが出来る。また、ここではパルス照射も有効である。5-アミノレブリン酸及びその誘導体の投与で誘導され、癌細胞に特異的に蓄積するポルフィリン類が増感剤として働くため、光照射で正常細胞より癌細胞がより多くのダメージを受けるが、治療時にはなるべく癌細胞に多くの光が照射されるように操作することが望ましいのは当然である。レーザー光の場合は焦点が絞りがすいためこの点でも有利な光源である。

治療は1回でも良いし複数回繰り返して行うこともできる。

治療による効果が十分であったかどうかには本発明の診断剤が有効に使えることは言うまでもない。即ち、本願発明は診断剤としても治療剤としても使用する診断剤兼治療剤の発明と言うこともできる。

同位体置換による影響は実用上無視して良い。

本発明診断剤を用いた診断法の原理は、5-アミノレブリン酸を投与した時に代謝物であるプロトポルフィリン IX に代表されるポルフィリン類が悪性腫瘍に集積することに基づいている。この現象が現れる理由については様々な研究機関で研究が進んでおり、悪性腫瘍においてはプロトポルフィリン IX をヘムに代謝するフェロキラーターゼの活性が低いのではないかとされているが今のところはっきりとした事は解っていない。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

製造例 1

表 2 に示した組成の培地（培地 1）1 L を、2 L の発酵槽に入れ、121℃で15分間滅菌し、室温に冷却した。

上記の発酵槽に、あらかじめ培地200mlを入れた1L容の坂口フラスコでしんとう培養して増殖させた光合成細菌変異株CR-520（FERM BP-5255）を接種し、30℃、通気量0.1 v/v/m、攪拌数200回転で培養を行った。培養開始後48時間後にグリシン-¹⁵Nを3g（Atom%-99、昭光通商（株）製、レブリン酸、グルコース、酵母エキスがそれぞれ5mM、50mM、1重量%になるように加え、また、pHが6.5から7になるように1N水酸化ナトリウム及び1N硫酸で調整した。更に、通気量を0.014 v/v/mに減少させ窒素ガスを0.086 v/v/mにて供給した。攪拌数は500回転とした。この条件で培養を84時間まで行った。培養後の5-アミノレブリン酸の濃度は2.3 g/Lであった。

得られた培養液を *Biochem. J.*, 219, 883-889 (1984) に記載の前処理方法に基づき前処理し、2-メチル-3-アセチル-4-(3-プロピオン酸ペンタフルオロベンジルエステル) ピロールを生成せしめ、GC/MS 分析により得られた¹⁴N を有する 5-アミノレブリン酸由来の 136 ($M^+ - (C_7H_2F_5 + CH_2CO_2)$) の分子ピークと¹⁵N を有する 5-アミノレブリン酸由来の 137 ($M^+ - (C_7H_2F_5 + CH_2CO_2)$) の分子ピークの比を比較し、ラベル化率を求めたところラベル化率は 48% であった。

本実施例より目的通りグリシンの含有した同位体が生産された 5-アミノレブリン酸に移行していることがわかる。

表 2

	g / L (蒸留水)
グルコース	9.0
グルタミン酸ナトリウム	3.8
リン酸 1 水素カリウム	0.5
リン酸 2 水素カリウム	0.5
硫酸アンモニウム	1.3
硫酸マグネシウム	0.2
塩化マグネシウム	0.053
硫酸マンガン	1.2×10^{-3}
ニコチン酸	1.2×10^{-3}
ビオチン	1.0×10^{-5}
チアミン	1.0×10^{-3}
酵母エキス	2.0

製造例 2

加えるグリシン- ^{15}N の量を 6 g とする以外は製造例 1 と同様に実施したところ生産された 5-アミノレブリン酸の濃度は 2.6 g/L、ラベル化率は 88%であった。

本製造例より添加するラベルグリシンの濃度が高いほど得られる 5-アミノレブリン酸のラベル化率は高くなることがわかる。

製造例 3

グリシン-2- ^{13}C を 6 g (Atom%-99、昭光通商(株)製)を用いた以外は製造例 2 と同様に実施したところ、得られた 5-アミノレブリン酸の濃度は 2.5 g/L であり、 ^{12}C を有する 5-アミノレブリン酸由来の 136 ($\text{M}^+ - (\text{C}_7\text{H}_2\text{F}_5 + \text{CH}_2\text{CO}_2)$) の分子ピークと ^{13}C を有する 5-アミノレブリン酸の 137 ($\text{M}^+ - (\text{C}_7\text{H}_2\text{F}_5 + \text{CH}_2\text{CO}_2)$) の分子ピークの比により計算したラベル化率は 91%であった。

製造例 4

製造例 3 と同様に培養した菌体をトリス塩酸バッファー (pH 8.1) で 3 回洗浄し、フレンチプレスにより破碎し蛋白質濃度 10 mg/ml の粗酵素液を調整した。これに ATP 10 mM、CoA-SH 1 mM、ピリドキサルリン酸 1 mM、スクシニル CoA 2 mM、塩化マグネシウム 10 mM、トリス塩酸バッファー 50 mM、グルタチオン 0.3 g/L、グリシン-2- ^{13}C (Atom%-99、昭光通商(株)製)を 1 g/L となるように添加し、33°C で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、得られた 5-アミノレブリン酸の濃度は 0.18 g/L であった。製造例 3 と同様の方法で求めたラベル化率は 98%であった。図 1 にその結果の NMR スペクトルを示す。

以上より酵素法によっても同位体を含む 5-アミノレブリン酸が製造可能なことがわかる。この製造例からは生産量は培養法よりも低下しているがラベル化率が高いという利点がある。更に、酵素法は一般に生体よりも放射線障害に強いので放射線同位体を含む 5-アミノレブリン酸の生産に有利であることが予想される。



実施例 1

(実験動物の作成)

右体側部皮下に、1匹当たり 2×10^6 個ずつヒト卵巣癌由来シスプラチン耐性培養細胞 A2480CP 細胞を移植し、3週間を経たヌードマウス (BALB C nu/nu 雌、癌直径約 8 mm) を用いた。

(^{13}C ラベル 5-アミノレブリン酸水溶液の調製)

5位の炭素を ^{13}C で置換した 5-アミノレブリン酸塩酸塩 (製造例 4) を用いた。この、5位の炭素が ^{13}C で置換された 5-アミノレブリン酸塩酸塩を 25 g/L の割合で蒸留水に溶解し水酸化ナトリウムで pH 7 に中和した。この溶液は中和により食塩濃度が 0.88% となった。

(投与実験及び測定)

中和した溶液を直ちに 0.22 μm のフィルターを通すことで滅菌し、体重 1 g 当たり 12 μl の割合でマウス尾静脈より投与した。この投与量は体重 1 kg 当たり 5-アミノレブリン酸塩酸塩 300 mg 投与に相当する。投与後 2 時間、4 時間及び 8 時間後にマウスを尊殺し、瀉血後癌細胞及び大腿部を摘出し 10 mm ϕ の NMR 試料管に同体積となるように詰め、日本電子社製、超伝導 NMR、JNM-A400 により、観測周波数 100.50 MHz、プロトンデカップリング法を用いて ^{13}C -NMR を測定した。

測定後、90~160 ppm までのピーク面積を積算し、投与後 8 時間の 1 匹目を 100 とした相対値を算出した。実験は各条件 2 匹ずつで行った。結果を表 3 に示す。



表 3

^{13}C 面積積分値	癌細胞	大腿筋肉	相対比 (癌／筋肉)
投与 2 時間 1 匹目	1 9	1 1	1 . 7
投与 2 時間 2 匹目	2 2	1 3	1 . 7
投与 4 時間 1 匹目	8 9	1 8	4 . 9
投与 4 時間 2 匹目	7 3	1 1	6 . 6
投与 8 時間 1 匹目	1 0 0	5 1	2 . 0
投与 8 時間 2 匹目	8 7	6 2	1 . 4

表 3 からは筋肉に比べ癌細胞で ^{13}C の存在が高いことが明らかである。この結果から ^{13}C ラベル 5-アミノレブリン酸を投与し ^{13}C -NMRで測定し ^{13}C の集積場所を調べることで悪性腫瘍の診断が可能である事が示された。本実施例は動物を用いたモデル実験であるが本実施例の結果より医療用のMRI技術と組み合わせ、人間で悪性腫瘍の画像診断に応用できることは容易に類推される。

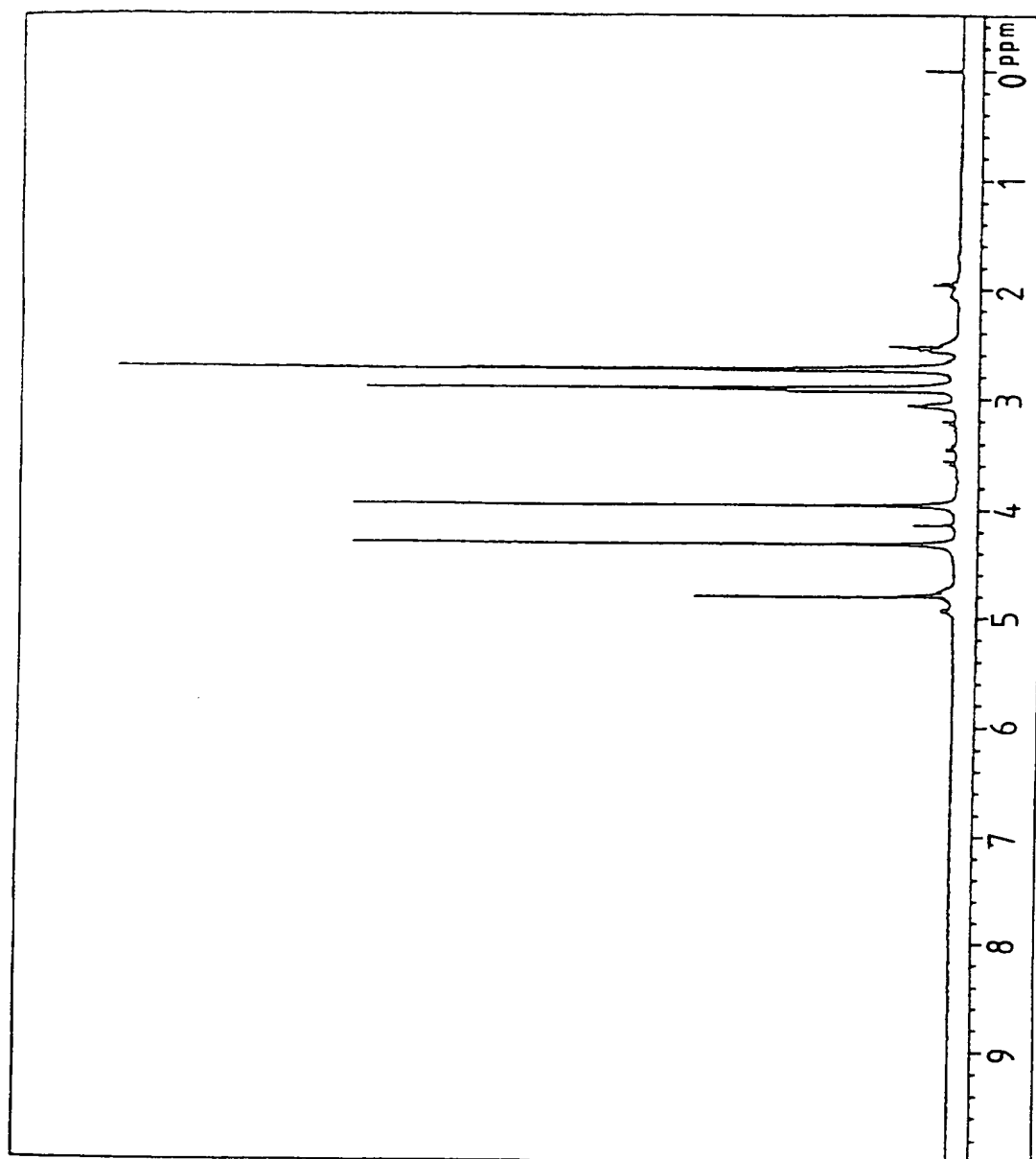
産業上の利用可能性

本発明の診断薬を用いれば悪性腫瘍を効果的に診断できる。とりわけ従来からの技術では難しかった組織深部の悪性腫瘍に関しても対応可能である。また、非破壊的にしかも画像診断できる技術として画期的な悪性腫瘍診断方法への応用の途を与えるものである。更に、本発明の同位体で置換された 5-アミノレブリン酸を用いれば光動力学的治療も可能である。

請 求 の 範 囲

1. 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物を有効成分とする悪性腫瘍診断剤。
2. 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物を有効成分とする光動学的悪性腫瘍治療剤。
3. 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物、および診断剤上許容される担体からなる組成物。
4. 5-アミノレブリン酸の1以上の炭素原子が炭素同位体であるかおよび／またはアミノ基の窒素原子が窒素同位体である化合物、又は該化合物のエステル、アミド、若しくは塩、水和物、または溶媒和物、および製薬上許容される担体からなる組成物。

第1図

製造例4の ^1H -NMRスペクトル

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K49/00, A61K41/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K49/00, A61K41/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Z. HUA et al., "Effectiveness of δ -Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin as a Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Vivo.", Cancer Res., Vol. 55, No. 8, p.1723-31	1-4
Y	WO, 97/03042, A1 (Mitsubishi Chemical Corp.), 30 January, 1997 (30. 01. 97), Claims ; page 1, 5th line from the bottom to page 2, line 2, 11th line to 1st line from the bottom; Test Example 1 & EP, 845457, A1	1-4
X Y	JP, 2-111747, A (Nippon Steel Chemical Co., Ltd.), 24 April, 1990 (24. 04. 90), Claims ; page 1, right column, lines 6 to 19 (Family: none)	3 1, 2, 4
Y	JP, 5-38294, A (Nippon Oil Co., Ltd.), 19 February, 1993 (19. 02. 93), Page 5, right column, lines 32 to 45 (Family: none)	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 August, 1998 (25. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
8 September, 1998 (08. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/02648

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. Wang et al., "An Efficient Synthesis of δ -Aminolevulinic Acid (ALA) and Its Isotopomers", Tetrahedron Letters, Vol. 38, No. 5, p.739-740	1-4
Y	JP, 4-9360, A (Cosmo Research Institute, Cosmo Oil Co., Ltd.), 14 January, 1992 (14. 01. 92), Claims (Family: none)	1-4

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02648

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K49/00, A61K41/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K49/00, A61K41/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Z. HUA et al., 'Effectiveness of δ -Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin as a Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Vivo.', Cancer Res., Vol. 55, No. 8, p. 1723-31	1 - 4
Y	WO, 97/03042, A1 (三菱化学株式会社), 30. 1月. 1997 (30. 01. 97), 特許請求の範囲, 第1頁下から第5行~第2頁第2行, 第2頁下から第11行~第1行, 及び試験例1 & EP, 845457, A1	1 - 4
X Y	J P, 2-111747, A (新日鐵化学株式会社), 24. 4月. 1990 (24. 04. 90), 特許請求の範囲及び第1頁右欄第6~19行 (ファミリーなし)	3 1, 2, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 08. 98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4 C

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P, 5-38294, A (日本石油株式会社), 19. 2月. 1993 (19. 02. 93), 第5頁右欄第32~45行 (ファミリーなし)	1-4
Y	J. Wang et al., 'An Efficient Synthesis of δ -Aminolevulic Acid (ALA) and Its Isotopomers', Tetrahedron Letters, Vol.3 8, No.5, p.739-740	1-4
Y	J P, 4-9360, A (株式会社コスモ総合研究所, コスモ石油 株式会社), 14. 1月. 1992 (14. 01. 92), 特許請 求の範囲 (ファミリーなし)	1-4